

肝疾患基础 及其实验动物模型

抗肝疾患药物开发的工具

刘克辛 主编

中国医药科技出版社

肝疾患基础及其实验动物模型

——抗肝疾患药物开发的工具

刘克辛 主编

中国医药科技出版社

登记证号：(京) 075 号

内 容 提 要

本书囊括了肝脏的基础、常用药物性肝损伤、酒精性肝障碍、缺血后再灌流性肝伤害、肝细胞凋亡、肝部分切除、病毒性肝炎、肝纤维化、肝癌等的原理、动物模型和有关治疗药物。本书可作为医药大专院校学生以及制药公司研究人员的工具书，还可作为医药学领域研究者的参考书。此外，还适应于临床医生以及具有一定知识的患者作参考。

图书在版编目 (CIP) 数据

抗肝疾患药物开发的工具：肝疾患基础及其实验动物模型/刘克辛主编. —北京：中国医药科技出版社，2003.5

ISBN 7-5067-2698-X

I. 抗… II. 刘… III. ①肝疾病-药物-开发②肝疾病-基本知识 IV. R575.05

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2003) 第 030554 号

*

中国医药科技出版社 出版
(北京市海淀区文慧园北路甲 22 号)
(邮政编码 100088)

北京市平谷区早立印刷厂 印刷
全国各地新华书店 经销

*

开本 787×1092mm $\frac{1}{16}$ 印张 16 $\frac{1}{4}$

字数 372 千字 印数 1—3000

2003 年 6 月第 1 版 2003 年 6 月第 1 次印刷

定价：27.00 元

本社图书如存在印装质量问题，请与本社联系调换 (电话：62244206)

前 言

笔者专著《肝细胞增殖因子(HGF)分子医学研究的最新进展》一书在天津科学技术出版社出版后,曾得到国内同行的支持和鼓励,并建议本人能够撰写一本有关肝脏病研究的动物模型著作,以填补国内空白。笔者不敢妄谈填补空白,但是作为学者,作为海外学子,笔者认为有义务、有责任撰写有关肝脏病研究的动物模型工具书,以求达到为祖国现代化建设添砖加瓦的梦想以求之愿望。

我国是世界上人口最多的国家之一,也是肝脏病、特别是肝炎病的高发区国家之一。根据不完全统计,我国约有肝炎患者和带肝炎病毒者近1亿2000万人,达我国人口的近十分之一,严重地威胁着人民的健康。尽管我国政府集中了人力、物力、财力努力攻克肝炎病,但目前对治疗肝炎病尚无特效的良药是全世界的现状。每年世界上有数以亿计的肝脏病、肝炎患者被病魔夺去生命,人们望眼欲穿的期待着治疗肝脏病、肝炎的灵丹妙药问世。研究抗肝脏病、抗肝炎的有效药物离不开动物实验,在当今时代,动物实验是药物进入临床的必经之路。因此,在抗肝脏病、抗肝炎药物开发过程中,选择有科学性、有实用性、有重复性的切实可行动物模型的重要意义就显得格外突出。科学的实验方法、能外推人体相应数据的动物模型是研究有效药物并及早进入临床的关键。这就是笔者撰写本书的出发点。

本书囊括了肝脏的基础、常用药物性肝损伤、酒精性肝障碍、缺血后再灌流性肝伤害、肝细胞凋亡、肝部分切除、病毒性肝炎、肝纤维化、肝癌等的原理、动物模型和有关治疗药物。本书可作为医药大专院校学生以及制药公司研究人员的工具书,还可作为医药学领域研究者的参考书。此外,还适应于临床医生以及具有一定知识的患者作参考。

如果本书对我国抗肝脏病、抗肝炎药物的开发、肝脏病研究以及分子医学研究方面能起到抛砖引玉作用的话,漂泊海外多年的学子将感到极大的欣慰。

日本东京大学药学博士

株式会社日本生物制剂研究开发部部长

刘克辛

2002年7月

作者简历

刘克辛，男，44岁（1958年8月9日生），1986年于中国大连医科大学医疗系药理学获硕士学位留校任教。硕士毕业论文为《天麻素的药代动力学》。研究成果曾获《中国青年药学工作者最新科研成果3等奖》和《辽宁省科学技术进步奖》。1989年获《霍英东青年教师奖》。1989年自费留学，1990年考入日本东京大学大学院药学部制剂学教研室课程博士研究生。1993年获药学博士学位。博士论文题目为《正常时及肝障害时肝细胞增殖因子的体内动态和肝移行动态的解析》。毕业后就职于（株）日本生物制剂研究开发部任研究员。从事抗肝炎病药物（肝细胞增殖因子、人胎盘提取物等）的开发和研究。现任（株）日本生物制剂研究开发部部长。共发表科研论文22篇，专著1部、共同主编著作1部、编委著作1部、参与编写著作2部，申请专利2项。联系地址：东京都练马区向山4-3-22 308室，邮编176-0022。Tel/FAX: 03-5936-8982。E-mail: liu@placenta-jbp.co.jp（中文可）。

目 录

第一章 肝脏的基础	(1)
第一节 肝脏的细胞及其特点	(1)
一、肝细胞	(1)
二、肝血窦	(2)
三、肝血窦细胞	(2)
四、胆管上皮细胞	(5)
第二节 肝脏的构成及其特点	(6)
一、细胞粘附因子	(6)
二、在肝细胞上表达的粘附因子	(10)
第三节 肝脏的功能	(10)
第四节 肝脏的血流调节	(10)
一、肝脏的血流供应	(10)
二、影响肝脏血流的因素	(11)
第五节 肝脏功能的调节因子	(12)
一、细胞因子	(12)
二、一氧化氮	(13)
三、活性氧	(19)
第六节 药物的肝脏内移行	(22)
一、评价药物肝脏内移行的实验法	(23)
二、肝脏指向性靶向给药	(25)
第二章 药物性肝炎	(29)
第一节 氨基半乳糖急性肝炎	(29)
一、氨基半乳糖的细胞内代谢、肝细胞障害机制及内毒素血症	(30)
二、外因性内毒素可促进氨基半乳糖的肝毒性	(31)
三、氨基半乳糖肝障害与肝 Kupffer 细胞的关系	(31)
四、中性白细胞对氨基半乳糖肝障害的影响	(34)
五、氨基半乳糖肝障害与肝细胞凋亡	(34)
六、氨基半乳糖肝障害的病理组织学特点	(34)
七、肝脏对氨基半乳糖肝障害的感受性依赖 LPS 基因	(35)
八、氨基半乳糖肝障害的动物模型及其药物治疗	(36)
九、氨基半乳糖肝障害的防御	(38)
第二节 脂多糖和死菌性肝炎	(39)
一、脂多糖和死菌性肝炎的发生机制	(40)
二、脂多糖和死菌性肝炎的动物模型	(41)
第三节 四氯化碳肝损害	(44)

2 肝疾患基础及其实验动物模型

一、急性四氯化碳肝损害模型 (<i>in vivo</i>)	(45)
二、急性四氯化碳肝损害模型 (<i>in vitro</i>)	(46)
三、慢性四氯化碳肝硬化模型 (<i>in vivo</i>)	(48)
第四节 二甲基硝胺肝损害动物模型	(48)
一、二甲基硝胺急性肝损害动物模型	(48)
二、二甲基硝胺慢性肝损害动物模型	(50)
第五节 ANIT 急性黄疸性肝炎	(51)
一、 <i>in vivo</i> ANIT 急性黄疸性肝炎大鼠模型	(52)
二、 <i>in vivo</i> ANIT 大鼠肝硬化模型	(53)
三、 <i>in vitro</i> ANIT 肝炎大鼠模型	(53)
第六节 Con A 诱导的自身免疫性肝炎	(54)
一、自身免疫性肝炎的概念和特征	(54)
二、Con A 与自身免疫性肝炎	(54)
三、药物毒性导致的自身免疫性肝炎机制	(56)
四、Con A 诱导的肝炎模型	(60)
第七节 扑热息痛肝损害	(63)
一、扑热息痛的肝毒性基础	(63)
二、扑热息痛肝损害动物模型	(66)
第八节 硫代乙酰胺诱导的肝炎	(69)
一、硫代乙酰胺诱导的急性肝炎动物模型	(70)
二、硫代乙酰胺诱导的肝硬化动物模型	(71)
第九节 异烟肼性药物肝炎	(72)
一、异烟肼的肝毒性	(72)
二、异烟肼性药物肝炎动物模型	(73)
第十节 迟发型变态反应性肝损伤动物模型	(75)
一、CD4 ⁺ T 细胞是引起 DTH 肝损伤的主要效应细胞	(75)
二、IFA-1/ICAM-1 的相互作用导致 DTH 肝损伤	(76)
三、细胞免疫反应是 DTH 肝损伤的主要机制	(76)
四、DTH 肝损伤动物模型可模拟临床肝炎的慢性化过程	(77)
五、DTH 肝损伤动物模型的制作方法	(77)
第三章 酒精 (乙醇) 性肝损伤	(81)
一、酒精的体内代谢过程	(81)
二、酒精性肝损伤的机制	(85)
三、酒精性肝疾患的类型及其发生机制	(87)
四、酒精性肝疾患的动物模型	(94)
第四章 缺血再灌流肝损伤	(98)
一、肝血液循环的特点	(98)
二、缺血再灌流肝损伤的发生机制	(98)
三、缺血再灌流肝损伤的动物模型	(99)
第五章 肝细胞凋亡动物模型	(103)
一、细胞凋亡的概念	(103)
二、细胞凋亡的分子机制及其有关因子	(104)

三、细胞凋亡的生理意义·····	(106)
四、细胞凋亡研究的方法·····	(107)
五、肝细胞凋亡研究的动物模型·····	(108)
第六章 肝再生动物模型 ·····	(111)
一、细胞周期·····	(111)
二、与肝再生有关的诸因子·····	(113)
三、肝部分切除后肝再生的机制·····	(130)
第七章 病毒性肝炎动物模型 ·····	(136)
一、乙型病毒性肝炎动物模型·····	(136)
二、丙型病毒性肝炎动物模型·····	(159)
第八章 肝纤维化 ·····	(175)
一、肝纤维化的病理学·····	(175)
二、纤维产生细胞和纤维的合成、分解·····	(177)
三、细胞外基质的构造、功能及与肝纤维化的关系·····	(177)
四、细胞外基质的合成、分解的调节与肝纤维化的关系·····	(188)
五、血清肝纤维化的标志物·····	(205)
六、常用的肝纤维化动物模型及其治疗·····	(210)
七、肝纤维化治疗药物的开发·····	(212)
第九章 肝癌 ·····	(221)
一、肝癌的组织病理学特征·····	(221)
二、实验性致癌动物模型·····	(234)
后记 ·····	(251)

第一章 肝脏的基础

第一节 肝脏的细胞及其特点

一、肝细胞

大小约 $18 \sim 30\mu\text{m}$ 的肝细胞（肝实质细胞）在组织学上属于上皮细胞，体积约为 $11000\mu\text{m}^3$ 。人的肝脏中约有 2500 ~ 5000 亿个肝细胞，肝细胞容积占肝脏容积的 80%，占肝脏重量的 60%，每克肝脏约有 223×10^6 个肝细胞。这些肝细胞组成约 50 ~ 100 万个肝小叶（hepatic lobule），肝小叶是肝脏在组织构造学上的基本单位。肝小叶为六角形状的多边棱状体，人的肝小叶直径为 0.7 ~ 2.0mm，高 0.5 ~ 2.0mm，一个肝小叶约含有 50 万个肝细胞

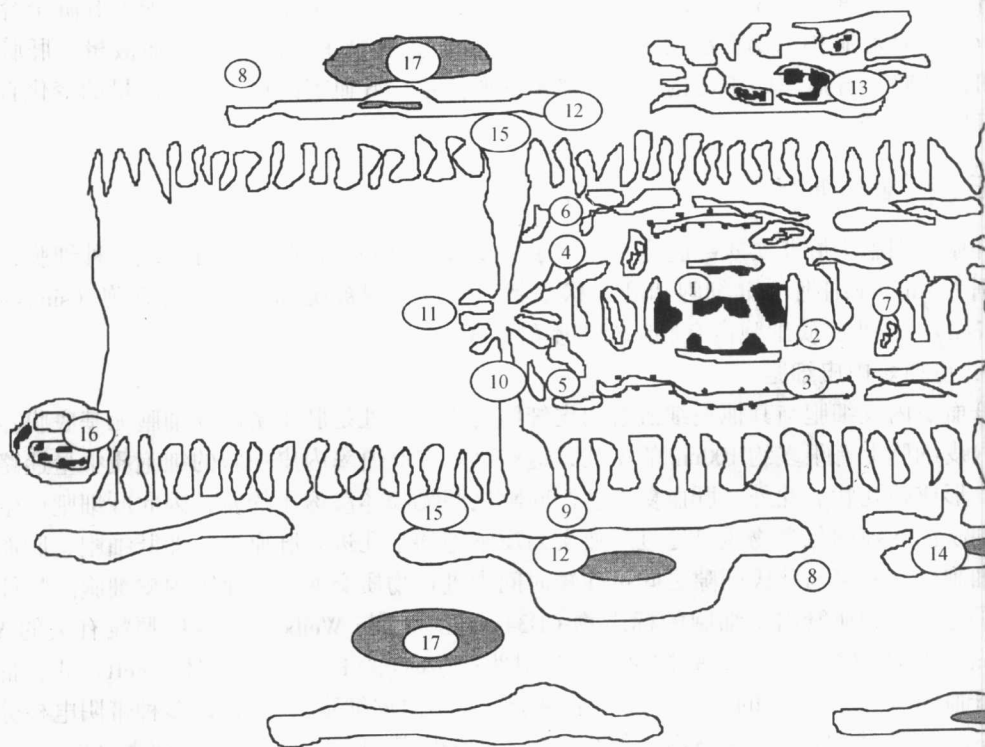


图 1-1 肝实质细胞和非实质细胞的模式图

1. 细胞核；2. 核膜；3. 粗面内质网；4. 核蛋白体；5. 滑面内质网；6. 高尔基体；7. 线粒体；
8. 肝血窦；9. 绒毛；10. 间隙；11. 毛细胆管；12. 内皮细胞；13. Kupffer 细胞；14. pit 细胞；
15. Disse 间隙；16. 肝星状细胞；17. 红细胞

胞。肝小叶以中央静脉为中心,其边缘有结合组织鞘(Glisson鞘)组成的门静脉区域(portal area),其中门静脉枝、肝动脉枝和胆管枝统称为portal triad。在portal triad周围还有神经和淋巴管。单排的肝细胞呈放射状排列,形成肝细胞索。若干肝细胞索相连成网状,网眼之间为肝血窦。肝血窦的内皮细胞与肝细胞之间存在着间隙,被称为狄氏(Disse)间隙。内皮细胞本身有小孔,孔上无隔膜,细胞之间有缝隙。内皮下基质不连续、不完整,并缺乏真正的基膜。肝血窦周围的网状纤维也不形成一个完整的膜,因而使得肝血窦和狄氏间隙呈开放式循环。再加上肝细胞的微绒毛伸入狄氏间隙,能直接与血液接触,同时肝细胞膜的通透性又大,故肝细胞中所含的多种物质的浓度与血液中同种物质浓度相同。一般毛细血管和一般组织的细胞膜仅能通过分子量10000以下的蛋白质,而肝细胞因有上述特点,故可让分子量40000左右的蛋白质通过。肝脏的上述结构特点,决定了肝脏具有与血液进行充分的物质交换的形态学基础。肝脏中肝实质细胞占有84%,肝血窦细胞约占15%,胆管细胞和成纤维细胞约占1%。肝细胞的细胞周期(cell cycle)约为300天。肝细胞及其周围细胞的模式构造见图1-1。

二、肝血窦

肝血窦为肝脏内特殊的毛细血管,直径约为7~15 μm 。肝血窦的容积约占肝脏全容积的10.6%。从心脏拍射出血液的1/5~1/4流入肝脏,肝脏重量的40%为血液量。肝脏的正常机能依赖于肝血窦的正常构造和肝血窦的血流量,肝血窦的损害和血流量的变化直接影响肝脏的功能。

三、肝血窦细胞

肝血窦细胞为肝非实质细胞之一,除了内皮细胞以外,在肝血窦可发现3种细胞,它们分别为Kupffer细胞,pit细胞和肝星状细胞。这些细胞被统称为肝血窦细胞(sinusoidal lining cell)。肝非实质细胞占有肝脏全细胞的6.3%。

1. 肝血窦内皮细胞

肝血窦内皮细胞与其他毛细血管内皮细胞的不同之处是肝血窦内皮细胞无基底膜。肝血窦内皮细胞上有很多约100nm的小孔,这些小孔在肝血窦内皮细胞的细胞质中呈迷路状贯穿,形成筛孔状。此外,肝血窦与狄氏间隙之间无胶体渗透压的差,因此肝细胞产生并分泌到狄氏间隙的化学物质可通过肝血窦内皮细胞的小孔进入肝血窦,即肝细胞、肝血窦内皮细胞、肝血窦与狄氏间隙之间可在短时间内进行物质交换。肝血窦内皮细胞的特征如下:①通常毛细血管内皮细胞的标志物CD34阴性;②与Weibel-Palade颗粒有关的Von Willebrand因子(第Ⅷ因子关联抗原)多为阴性;③IgG的Fc部位的受体(FcR)Ⅱ、Ⅲ阳性(肝血窦壁的Fc受体的70%~80%来源于肝血窦内皮细胞);④认识多种带阴电核分子的Scavenger受体阳性;⑤Mannose受体阳性;⑥CD14阳性[CD14为脂多糖类(lipopolysaccharide, LPS)结合蛋白的受体];⑦CD13阳性(CD13为氨基肽酶);⑧与MHC class II抗原结合的CD4以及细胞间接着分子-1(intercellular adhesion molecule-1, ICAM-1)在肝血窦面的细胞膜上呈阳性等;⑨正常肝的肝血窦内皮细胞上血管内皮白细胞接着分子-1(Endothelial leukocyte adhesion molecule, ELAM-1)和补体的受体缺如。肝血窦内皮细胞的

功能特征总结如下：①通过旁分泌机制调节肝血窦的血流。肝血窦内皮细胞可产生并分泌使血管平滑肌强烈收缩的血管活性肽内皮素，内皮素作用于肝星状细胞的内皮素受体 ETA 和 ETB 上而使肝星状细胞收缩，从而调节肝血窦壁的紧张度而调节肝血流。②肝血窦内皮细胞是处理、分解血中透明质酸的主要细胞。肝血窦内皮细胞上存在很多细胞外间质成分的受体，包括透明质酸的受体，透明质酸与肝血窦内皮细胞上的透明质酸受体结合后通过肝血窦内皮细胞的胞饮作用（endocytosis）而被处理、分解。③维持肝脏的多种功能。由于肝血窦内皮细胞上存在很多受体，故可通过摄取、向细胞内移送、在细胞质分解以及向 Disse 间隙分泌等作用而起到机体防御的清道夫作用等。

2. Kupffer 细胞

肝脏中的 Kupffer 细胞是巨噬细胞（macrophage）的一种，大多数来源于血液的单核细胞。Kupffer 细胞的形态不规则，细胞边缘部有很多微绒毛和许多形状不规则的细胞突起。占有细胞 60.9% 的细胞质内含有丰富的粗面内质网和高尔基体，细胞核较大，形态为椭圆形 - 不规则形，核质较淡。Kupffer 细胞在肝小叶内的分布不均匀，在 Zone I 区分布较密，细胞形状较大。Kupffer 细胞的特征如下：① β -葡萄糖苷酸酶（ β -glucuronidase）阳性，而该酶在肝血窦内皮细胞则为阴性，因此可根据有否 β -葡萄糖苷酸酶来鉴别 Kupffer 细胞和肝血窦内皮细胞；②MHC class II 抗原强阳性；③细胞质可被 CD68（KP1）抗体强染色，CD68（KP1）抗体常常用来作为 Kupffer 细胞的标志物；④细胞粘附因子 LFA-1 阳性。Kupffer 细胞有很多生理功能，具有代表性的生理功能如下：①吞食异物功能，故可成为肝脏的卫士；②Kupffer 细胞有 $\text{Fc}\gamma$ 、C3、糖蛋白和激素等受体，故可作为提供抗原提示能的免疫细胞；③分泌产生多种生理活性物质，如 $\text{TGF}-\alpha$ 、 $\text{TGF}-\beta$ 、 $\text{TNF}-\alpha$ 、 $\text{IL}-1$ 、前列腺素 D2、E2、F2 等；④产生一氧化氮（NO）而松弛血管平滑肌，从而拮抗内皮素（endothelin）的作用；⑤通过旁分泌的机制使肝星状细胞松弛，从而调节肝血窦血流等。

Kupffer 细胞在激活前不能杀伤肿瘤细胞。分离 Kupffer 细胞的方法似乎能轻微地激活它并产生较低水平的细胞毒性，然而将 Kupffer 细胞移接到平皿中后，它就进入静止状态。葡聚糖、hGM-CSF、 $\text{IFN}-\alpha$ 、糖脂、淋巴因子、muramyl 多肽、OK432 及 $\text{IL}-2$ 等均可激活 Kupffer 细胞。如果将上述刺激因子包入脂质小体，那么它们的激活 Kupffer cell 的效应显著增强，因为这些脂质小体可以被 Kupffer 细胞特异性地吞噬。Kupffer 细胞的激活与一氧化氮（NO）的量有关，人们发现超氧化物歧化酶不能完全阻止 Kupffer 细胞的杀肿瘤作用，这表明还有自由基以外的其他因素可以激活 Kupffer 细胞，如抗 $\text{TNF}-\alpha$ 抗体亦可以抑制 Kupffer 细胞的活性。

3. pit 细胞

1976 年，荷兰的 Wisse 等在电子显微镜下首次发现了 pit 细胞。pit 细胞的直径约为 7~11 μm ，为大型颗粒淋巴球形状。pit 细胞的细胞核为偏在性，细胞质内有很多直径约为 0.25~0.5 μm 的颗粒，被称为 dense core granules。此外还可见很多直径约为 0.2 μm 的小空泡（rod-core vesicle）。多颗粒为 pit 细胞的特点之一，pit 为荷兰语，意为颗粒。pit 细胞在中文被翻译为陷窝细胞。该细胞的细胞器往往位于核的一侧，而另一侧为透明的胞质。

pit 细胞的数目少于 Kupffer 细胞和内皮细胞。pit 细胞与 Kupffer 细胞的在数量上的比例约为 1:10^[6]。Kupffer 细胞的数量约为每克肝组织 $1.4 \times 10^7 \sim 2 \times 10^7$ 个，而肝组织中的 pit

细胞数则为 $2.7 \times 10^6/\text{cm}^3$ 。组织切片中, 陷窝细胞的数目为 $13.7/\text{mm}^2$ 。pit 细胞在肝内均匀分布, 但在肝小叶内分布不均匀。门脉区周围, pit 细胞数为 $17.1/\text{mm}^2$; 而在活性高的中心区, pit 细胞数量较少, 一般为 $10.8/\text{mm}^2$ [7]。

用肝灌流的方法可分离 pit 细胞。灌流液内不含酶类及 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} , 但含有 0.1% 的 EDTA。用此方法, 每克肝组织可得到 3.6×10^6 个细胞。由于嗜天青颗粒在 Giemsa 染色中深染, 故据此可在光镜下识别大鼠的 pit 细胞。大鼠肝灌流液中各细胞比例如下: T 细胞 (43%), NK 细胞 (26%), B 细胞 (10%), 单核细胞 (3.3%), 内皮细胞及 Kupffer 细胞不足 1%。人肝脏灌流液中颗粒淋巴细胞 (LGL) 为 44%, 9% 为单核/巨噬细胞, 9% 为颗粒细胞, 其他细胞占 5%, 人肝脏中 NK 细胞与 T 细胞的比为 0.7:1。通过离心法可对 NK 细胞进一步纯化, 由于 pit 细胞不具粘附性, 可利用这一性质将之与 B 细胞等粘附性细胞分离。最后将获得的细胞在 45% 等渗的 Percoll 液中离心, 可得到位于顶部的低密度细胞带及位于底部的高密度细胞带。低密度细胞带中 63% 为 LGL。用 Percoll 精制后的细胞, 其活性几乎为 100%。这样最终可以从每克肝组织中获取 10^6 个 LGL。肝灌流法的优点是不使用胶原酶或混杂有蛋白酶的其他酶类, 避免了这些酶对细胞表面糖蛋白的破坏。

有人使用磁性细胞分离器成功地对肝灌流液中的 pit cell 进行了提纯。这种方法的原理是使用特异性抗体选择性地将悬浮液中的细胞分离出来。标记的细胞与标有二抗的铁粒发生反应, 在磁场的作用下, 标记的细胞吸附于装有铁粒的分离柱中, 而流出液中为未标记的细胞。用此法得到的 pit 细胞纯度及活性分别为 90% 和 95%, 整个过程大约只需 3 小时, 结果具有可重复性。从一只 250g 的大鼠肝脏中可分离得到 2~3 百万个细胞。

培养中的 pit 细胞很难保存超过 1 天, 但是体内 pit 细胞的生存期为 1~2 周, 这说明 pit 细胞活性及功能的保存依赖于整体的生理环境。

pit 细胞属于 NK (natural killer) 细胞, 其功能为参与构成肝脏的防御系统, 并维持肝脏的恒定性。pit 细胞的特征如下: ①具有 dense core granules 和 rod-core vesicle; ②抗 Asialo GM1 抗体阳性 (大鼠、小鼠为阳性, 人的肝组织中 HE 染色标本很难确认 pit 细胞); ③无吞噬功能; ④不具粘附性等。

4. 肝星状细胞

肝星状细胞 (stellate cell) 又被称为伊东细胞 (Ito cell), 脂肪储存细胞 (fat storing cell), 该细胞在 1951 年被日本的伊东俊夫教授在光学显微镜下观察人的肝脏时发现, 故命名为伊东细胞。肝星状细胞直径约为 $10\mu\text{m}$ 。与肝细胞在数量上的观察比约为 1:20, 有时夹在两个肝细胞之间。肝星状细胞的形态和功能特点如下: ①调节肝血窦的血流。肝星状细胞上有内皮素受体 ETA 和 ETB, 其毗邻的肝血窦内皮细胞产生的内皮素作用于内皮素受体上, 从而通过调节细胞的收缩、松弛而维持血管的紧张度, 进而调节肝血流。此外, 当肝星状细胞被激活后, 细胞自身可产生内皮素-1 (ET-1) 和一氧化氮, 前者收缩、后者舒张血管, 通过自主分泌的作用而调节肝血流。另外, 肝星状细胞上还存在神经细胞粘附分子 (neural cell adhesion molecule, N-CAM), 通过神经刺激的作用也可使肝星状细胞收缩; ②储存、代谢维生素 A。肝星状细胞的细胞质内含有丰富的 (约占细胞的 25.34%)、直径约为 $0.8 \sim 3\mu\text{m}$ 的小脂肪滴, 脂肪滴内含有大量的维生素 A。人体全身维生素 A 量的 90% 储存在肝脏, 而该量的 80% 储存在肝星状细胞的小脂肪滴中。除了储存

维生素 A 外,肝星状细胞还可促进维生素 A 的代谢。从肠道被吸收的维生素 A 以其脂型与 chylomicron 结合,经过淋巴输送而进入大循环入肝,细胞内的脂型维生素 A 被水解后变成 retinol,后者与 retinol 结合蛋白 (retinol binding protein, RBP) 结合后形成 retinol - RBP 复合体而进入 Disse 间隙被肝星状细胞通过 RBP 受体而摄取,脂化后储存在脂肪滴中。肝星状细胞对维生素 A 的摄取、储藏、放出等通过 RBP 而被调节;③调节细胞外间质的代谢。肝星状细胞可产生 I、III、IV、VI 型胶原纤维,昆布氨酸 (laminin)、纤连蛋白 (fibronectin) 等 Disse 间隙的细胞外基质^[1,2],此外还可产生蛋白多糖 (proteoglycan, PG)。培养肝星状细胞实验表明,肝星状细胞产生的蛋白多糖主要是硫酸软骨素 (CS)、硫酸皮肤素蛋白多糖和透明质酸。肝星状细胞还可产生少量的 HSPG (heparan sulfate proteoglycan, 硫酸乙酰肝素蛋白多糖)。以单位细胞产生的蛋白多糖量计算,肝星状细胞产生蛋白多糖的量是肝实质细胞的 2~6 倍^[2],随着培养时间的推移,蛋白多糖的产生量增加。与肝细胞不同的是,肝星状细胞产生的蛋白多糖几乎均向细胞外分泌。肝星状细胞还可产生 tenascin, tenascin 又被称为肌腱结合部位抗原、cytotactin、hexabrachion 和 GEM, Tenascin 的生物学功能为促进红细胞凝集和促进细胞接着。肝纤维化时增加的 Tenascin 被认为是由肝星状细胞产生的^[3,4]。经确认,肝星状细胞可产生 decorin 和 biglycan。除了可产生蛋白多糖外,肝星状细胞还可产生其他细胞外基质,并将其分泌向细胞外。在肝纤维化的形成中,肝星细胞起到了重要的促进作用。肝星状细胞除了可产生促进肝纤维化的上述细胞外基质以外,还可产生分解细胞外基质、特别是分解胶原纤维的基质金属蛋白酶 (matrix metalloproteinase, MMP) 以及 MMP 的抑制剂 TIMP (tissue inhibitors of metalloproteinase, 金属蛋白酶组织抑制剂)。因此说肝星状细胞通过上述功能而调节细胞外基质的生成和代谢。

四、胆管上皮细胞

两个邻接的肝细胞接触面形成毛细胆管,毛细胆管由胆管上皮细胞组成。组成肝脏的细胞有两种属于上皮细胞,一个是肝细胞,另一个是胆管上皮细胞。胆管上皮细胞的形态有扁平、立方和圆柱体形多种,其细胞体呈淡明状,嗜酸性。与肝实质细胞相比,胆管上皮细胞的胞体较小,细胞内细胞器也不如肝细胞发达,特别是线粒体含量少,粗面内质网也不发达。胆管上皮的下面有基底膜 (basement membrane),该基底膜的最短径作为胆管的外径而被测量。胆管细胞的管腔侧 (apical pole or luminal surface),细胞间侧 (lateral surface) 和基底侧 (basal surface) 的细胞有极性。此外,在基底膜上,D-PAS 染色可呈现阳性,由于肝细胞上不存在该基底膜,故可根据有否基底膜来区别肝细胞和胆管细胞。

胆管壁由单层胆管细胞组成,胆管可分为隔壁胆管 (外径 100~300 μ m)、小叶间胆管 (外径 < 100 μ m)、毛细胆管和 Hering 管。胆管的功能是将产生的胆汁进行输送。肝内胆管系可通过电解质、葡萄糖、尿酸盐等的分泌、吸收而调节胆汁的组成、胆汁量和胆汁流量。此外,肝内胆管还可通过胆管细胞上表达的分泌成分而促进 IgA、IgM 等免疫蛋白向胆汁中分泌,因此说胆管细胞在胆道系的免疫和感染防御机制上起了重要的作用。

隔壁胆管的胆管细胞核上部的胞体上有微细的粘液颗粒,在光镜和电镜下均可见到,用粘液染色法和 d-PAS 染色可被检出。另外,在胆管细胞上有与 lectin 特异性结合的糖链,如 DBA (dolichos biflorus agglutinin)、SBA (soybean agglutinin) 和 PNA (peanut agglu-

tinin) 等与胆管细胞均有结合性, 在鉴别胆管细胞上有重要的作用。除此之外, 上皮膜抗原 (epithelial membrane antigen, EMA), 组织多肽抗原 (tissue polypeptide antigen, TPA), 癌胎儿性抗原 (carcinoembryonic antigen, CEA) 等化学成分可在胆管细胞明显表达, CEA 还可从胆管细胞向胆汁中分泌, 由于这些抗原成分不能在肝细胞表达, 故可利用这些抗原成分来鉴别肝细胞和胆管细胞。

几乎所有的胆管细胞都含有 γ -GTP (γ -glutamyltranspeptidase), 故可通过测定 γ -GTP 来鉴别胆管细胞。此外, 胆管细胞存在 CK (cytokeratin) 7 和 CK19, 而肝细胞则为阴性。胆管细胞生理上仅存在微量的 HLA (human leukocyte antigen) class I 抗原, 但是当胆道病变时, 特别是原发性胆汁性肝硬化、原发性肝硬化胆管炎时, HLA class I 抗原的表达可增强。生理情况下, 胆管细胞还可表达细胞因子, 如 TGF- α 、IL-6 等。

第二节 肝脏的构成及其特点

一、细胞粘附因子

组成肝脏的细胞并不是各自为政的, 这不仅仅表现在组织构成上, 而且还反映在细胞的功能方面, 细胞之间粘附在一起而组成机体, 从而实行正常的生理功能。同一类型的细胞通过识别而粘附, 不易分开, 这种细胞粘附 (adhesion) 现象早在 1907 年就被 Wilson 注意到。70 年代末, 借助免疫识别的方法, 初步确定细胞粘附分子 (cell adhesion molecule, CAM) 的存在。细胞之间的粘附方式有细胞-细胞粘附 (cell-cell-adhesion) 和细胞-细胞外基质粘附 [cell-ECM (extracellular matrix)-adhesion] 两种。细胞外基质包括胶原纤维、弹性蛋白、蛋白多糖以及多种糖蛋白等, 这些细胞外基质的组成及特点将在肝纤维化章节中介绍。在细胞之间以及细胞-细胞外基质粘附方面起重要作用的是细胞粘附因子。在诸多的细胞粘附因子中, integrin、钙粘蛋白等尤为重要。

1. integrin 超家族

integrin (粘合素) 又被译为整合素。1986 年有人描述一个膜受体家族, 此家族的粘附分子主要介导细胞与细胞外基质的粘附, 使细胞得以附着而形成整体 (integration), 故得名为整合素或粘合素。integrin 的主要生理功能是连接细胞外基质和细胞内的细胞骨骼 (cytoskeleton), 此外, 粘合素家族的粘附分子还介导白细胞与血管内皮细胞的粘附。

integrin 家族的粘附分子都是由 α 、 β 两条链由非共价键连接组成的异源双体 (heterodimer), α 、 β 链均为 I 类穿膜蛋白。 α 链的分子量为 120~210kD, β 链的分子量为 90~130kD, 个别 β 链 (如 β_4) 分子量为 220kD。不同的 α 链 (或称亚单位) 或 β 链 (或称亚单位) 氨基酸组成和序列有不同程度的同源性, 在结构上有其共同的特点。 α 和 β 亚单位均由胞膜外区、胞浆区、穿膜区三部分组成。胞浆区一般较短, 可能和细胞骨架相联。穿膜区富含疏水氨基酸。 β 亚单位的胞膜外区含有 4 个富含半胱氨酸的重复序列, 靠近外侧 N 端的 40~50kD 的氨基酸残基通过链内二硫键紧密折叠在一起; α 亚单位的胞膜外部分有 7 个同源重复序列, 靠近外侧 N 端的 3 个或 4 个重复序列中含有 Asp-X-Asp-X-Asp-Gly-X-X-Asp 或类似结构, 与 integrin 分子结合二价阳离子 (Mg^{2+}) 有关, 并与 β 亚单

位共同构成 integrin 分子的配体结合部位, 其中 α 亚单位的二价阳离子结合区与 integrin 分子配体结合的特异性和亲和力有关。某些 integrin 分子的 α 亚单位在转录后被剪接为两段, 一段为穿膜部分, 较小, 约 20 ~ 30kD; 另一段为胞膜外部分, 较大。两者通过二硫键连接起来。电镜下可见 integrin 分子有一个球状头部, 向下伸展有两条杆状结构穿过细胞膜的磷脂双层。

目前已知 integrin 至少有 14 种 α 亚单位和 8 种 β 亚单位, 一个 β 亚单位可与复数的 α 亚单位结合。除 α_7 和 α_{IEL} 外, 其他 integrin 分子亚单位均已基因克隆成功。 α 亚单位和 β 亚单位组合构成 integrin 分子并不是随机的, 多数 α 亚单位只能与一种 β 亚单位结合构成异源双体, 但也有的 α 亚单位可与几种不同的 β 亚单位组合, 如 α_V (CD51) 可分别同 β_1 、 β_3 、 β_5 、 β_6 和 β_8 亚单位组成 integrin 分子, 而大部分 β 亚单位则可以结合数种不同的 α 亚单位。目前按 β 亚单位的不同可将 integrin 家族分为 8 个不同的组, 在同一组中的粘素分子不同成员 β 链相同, α 链不同。已知 α 链和 β 链有 20 种组合形式, β_1 、 β_3 、 β_4 、 α_3 和 α_6 等亚单位的 mRNA 分子可有不同的剪接形式, 更增加了 integrin 分子的多样性。

integrin 分子在体内分布很广泛, 多数 integrin 分子可以表达于多种组织细胞, 如 VLA 组的 integrin 分子在体内广泛分布于各种组织细胞; 而多数细胞可同时表达数种不同的 integrin 分子, 用体外哺乳动物来源的细胞系所做的 integrin 分子表达研究时发现, 每一种细胞系可同时表达 2 ~ 10 种不同的 integrin 分子, 但不同类型的细胞表达 integrin 分子的种类是不同的。integrin 的配体有纤连蛋白 (fibronectin, FN)、胶原纤维 (collagen)、昆布氨酸 (laminin) 等。很多 integrin 可与多种细胞外基质成分结合, 但是某些 integrin 分子的表达则具有明显的细胞类型特异性, 如 gp II b/III a ($\text{II b}/\beta_3$) 主要表达在巨核细胞和血小板; LAF-1、Mac-1、P150/95 只表达在白细胞表面; $\alpha_6\beta_4$ 特异性表达在上皮细胞; 与纤连蛋白结合的代表性 integrin 分子为 $\alpha_5\beta_1$, 后者可认识纤连蛋白细胞结合部位的 RGD (Arg-Gly-Asp) 序列并与其结合, 从而促进细胞与纤连蛋白粘附。纤连蛋白与 β_1 、 β_3 、 β_5 、 β_6 和 β_7 等多组 integrin 分子受体结合, 对细胞的生长、分化、活化、移动等过程具有重要的调节作用。每一种细胞 integrin 分子的表达可随其分化与生长状态的改变而变化。

(1) integrin 分子识别配体的短肽序列

integrin 分子在与配体结合时所识别的只是配体分子中由数个氨基酸组成的短肽序列。不同的 integrin 分子可能识别相同的短肽序列或同一个配体中不同的短肽序列。由于同一短肽序列可以存在于几种不同的配体中, 因此, 每一种 integrin 分子可能有几种细胞外间质成分做为配体, 而每一种细胞外间质中的配体也可能被几种不同的 integrin 分子所识别。

a. 识别 RGD 序列的 integrin 分子

$\alpha_5\beta_1$ 、 $\alpha_V\beta_1$ 、 $\alpha_{IIb}\beta_3$ 、 $\alpha_V\beta_3$ 、 $\alpha_V\beta_5$ 、 $\alpha_V\beta_6$ 都可以识别配体分子中的 RGD 序列。多种细胞外间质成分都含有 RGD 序列, 它们在体内的分布极为广泛。含有 RGD 序列的人工合成肽可以抑制上述 integrin 分子与配体的结合。

b. 识别非 RGD 序列的 integrin 分子

$\alpha_2\beta_1$ 、 $\alpha_4\beta_1$ 、 $\alpha_X\beta_2$ 、 $\alpha_{IIb}\beta_3$ 、 $\alpha_4\beta_7$ 可分别识别其配体分子中 DGEA、EILDV、GPRP、KQAGDV、EILDV 等短肽序列, 其中 KQAGDV 具有与 RGD 类似的结构。上述短肽序列可以与 RGD 序列存在于同一个配体分子中, 如纤连蛋白分子中同时存在 RGD 和 EILDV

序列。

c. 识别序列尚未明确的 integrin 分子

包括 $\alpha_1\beta_1$ 、 $\alpha_6\beta_1$ 、 $\alpha_7\beta_1$ 、 $\alpha_8\beta_1$ 、 $\alpha_L\beta_2$ 、 $\alpha_M\beta_2$ 、 $\alpha_6\beta_4$ 、 $\alpha_{IEL}\beta_7$ 、 $\alpha_V\beta_8$ 等。

2. cadherin

cadherin 被译为钙粘蛋白，钙粘素等。Takeichi 最早发现体内存在一种介导细胞间相互聚集的粘附分子，这种粘附分子在有 Ca 离子存在时可以抵抗蛋白酶的水解作用，遂将其命名为 cadherin。cadherin 位于细胞的粘附带（zonula adherens）内，大部分为膜蛋白，分子量约为 120~135kD。胰酶裂分 γ 产物为 81kD 肽，含 N-端碳水化合物。成熟 cadherin 蛋白的 N-末端在细胞外，C-末端在细胞质侧。cadherin C-末端的 70 个氨基酸残基有与细胞质蛋白 catenin 结合部位。cadherin 的生理功能是介导细胞-细胞粘附，即同质性粘附。所谓同质型粘附是指同种细胞与细胞之间的粘附，主要由存在于细胞表面的粘附分子所介导。同质型粘附下降促进瘤细胞从瘤体上脱落下来，所以粘附分子在肿瘤侵袭和转移中起着重要作用。cadherin 的这种作用是通过它与 α -、 β -、 γ -catenin 结合成复合物，然后与细胞骨架起反应来实现的。

目前发现 cadherin 的类型有十余种，按分子组成，具有代表性的 cadherin 可分为 3 组：①上皮性钙依赖粘附蛋白（Epithelia-cadherin, E-cadherin）。这一组包括在 Fa 畸胎瘤细胞中发现的 E-cadherin，小鼠胚囊发现的 uvomorulin，人乳腺癌发现的 cell-CAM120/80，狗肾上皮发现的 arc-1 和鸡胚心肌润盘 A-CAM 以及鸡胚神经视网膜的 N-cal-CAM；②神经钙依赖粘附蛋白（neural-cadherin, N-cadherin）：这一组包括鸡胚心肌润盘 A-CAM 以及鸡胚神经视网膜的 N-cal-CAM；③胎盘钙依赖粘附分子（placental-cadherin, P-cadherin），这一组织存在于上皮细胞也存在于非上皮细胞，主要出现在胎盘组织。adherin 在胞浆中合成，合成后弥漫出现于胞膜，然后逐渐集中到粘附带。Bemdorff D 等在大鼠肝克隆了新的 cadherin 家族 liver-intestine (LI)-cadherin^[8]，LI-cadherin 与 E-cadherin 相比，有如下特点：①细胞外 domain 的反复构造多一个；②细胞质 domain 仅有 18 个氨基酸残基；③无 catenin 结合 domain。LI-Cadherin 在肝脏和小肠表达较强，而在肾脏、脾脏、胃、肺脏、食道等几乎无表达。

E-cadherin 是研究得最多的同质性粘附分子，目前认为癌细胞 E-cadherin 的丢失程度与其侵袭能力直接相关。用小鼠 E-cadherin cDNA 质粒转染缺失 E-cadherin 的高侵袭细胞系后，该细胞系的侵袭能力消失，但用特异抗体或反义处理后，又可恢复其侵袭性。近年来有人用免疫组化技术研究了 E-cadherin 与结肠、直肠癌的关系。结果表明，E-cadherin 在正常粘膜上皮高水平表达，在分化良好的肿瘤中的表达水平也较高，在中等分化的癌细胞表达下降，而分化差的癌细胞和 10 例淋巴结转移灶则无表达。类似的结果在肝癌，胃癌，食管癌，前列腺肿瘤等的研究中也得到了证实。大量的研究还表明 E-cadherin 表达下调或丢失会促进肿瘤的侵袭和转移，E-cadherin 表达下降预示着肿瘤病人的预后不良。Gonzalez MA 等的免疫组织化学研究结果表明，20%的乳腺癌 E-cadherin 抗体反应阴性，即缺乏 E-cadherin 表达；24%的乳腺癌缺乏 α -catenin 表达，22%乳腺癌缺乏 β/γ -catenins 表达^[15]。有学者认为，E-cadherin 与 catenins 复合物的缺失（而不仅仅是 E-cadherin 表达的缺失）在维持肿瘤表型特征中是一个关键的步骤。

cadherin 在肿瘤侵袭和转移中具有的重要作用, 已引起了研究界的高度关注。

3. NCAM (neural - cell adhesion molecule)

NCAM 为神经细胞粘附因子。NCAM 是一组多肽链, 每一条链都有 5 个连续的同源区, 区内有一个链内二硫键, 与免疫球蛋白超家族类似。5 区之后为类似于纤维粘连蛋白 III (fibronectin III) 重复系列的重复区。不同肽链的差别既表现在胞浆区的不同, 也表现在与细胞膜连接的方式不同。

与其他粘附分子一样, NCAM 与其他粘附分子的结合能在胞内启动多种信号的传递过程, 该信号传递途径与其他受体的信号传递途径实现对接: ①受体酪氨酸激酶途径 (receptor tyrosine kinase pathway, RTK)。这条途径开始于 RTK, ras 是该途径的中心, 故又称 ras 途径。RTK 与各种生长因子结合后, 受体在膜上集中, 并导致激酶的激活和特异酪氨酸残基的自动磷酸化。ras 激活后, 通过对转录因子的磷酸化, 将信号传到胞核, 但该途径并无特异性, 其他信号途径可与之相通; ②G - 蛋白途径; ③其他途径。一些细胞因子如白介素的受体可激活胞浆性酪氨酸激酶家族的 the janus kinases (JAK - STAT), 该激酶可启动 ras 信号传递途径, 也可直接激活被称为 STATs 的胞浆蛋白, 从而调控某些基因转录。

NCAMs 作为神经元胞膜上的结构分子, 既参与了常规的跨膜信号传递, 又参与形态结构的形成与维持, 因而在突触活动, 特别是可塑性活动中发挥了特殊作用。

4. selectin

selectin 是由 select 和 lectin 两词合并而来, 国内有人将其译为凝集素。selectin 分子为 I 型穿膜的糖蛋白, 可分为胞膜外区、穿膜区和胞浆区。selectin 家族各成员胞膜外部分有较高的同源性, 结构类似, 均由三个结构域构成。①其外侧氨基端 (约 120 个氨基酸残基) 为钙离子依赖的 C 型外源凝集素结构域 (calcium dependent lectin domain), 可以结合碳水化合物基团, 是 selectin 分子的配体结合部位; ②紧邻外源凝集素结构域是表皮生长因子样结构域 (epidermal growth factor - like domain), 约含 35 个氨基酸残基, EGF 样结构域虽不直接参加配体的结合, 但对维持 selectin 分子的构型是必需的; ③近胞膜部分是数个由约 60 个氨基酸残基构成的补体调节蛋白 (complement regulatory protein) 重复序列或称为补体结合蛋白 (complement binding protein) 重复序列, 它们与补体受体 (如 CR1、CR2 等) 和 C4 结合蛋白 (C4bp) 等结构同源。各种 selectin 分子的穿膜区和胞浆区没有同源性。selectin 分子的胞浆区与细胞内骨架相联, 去除胞浆部分的 selectin 分子虽仍可结合相应配体, 但一旦去除了胞浆部分, 则失去了其介导细胞间粘附的作用。

现已发现 selectin 家族中由三个成员组成: leukocyte - selectin (L - selectin)、platelet selectin (P - selectin) 和 endothelium - selectin (E - selectin)。与其他粘附分子不同, selectin 分子识别的配体都是一些寡糖基团。某些肿瘤细胞表面及血清中某些糖蛋白分子上都存在有 selectin 分子识别的碳水化合物基团。selectin 分子对寡糖结构识别的特异性是相对的, 它往往可以结合与其特异配体结构类似的寡糖, 只是结合的亲和力较低。如 P - selectin 不仅可以结合 CD15 分子 (lacto - N - fucopentaose, LNF III), 还可以结合 LNF III 的一种异构体 LNF II。目前对于这种特殊的受体 - 配体结合的研究主要采用以下几种方法: ①抗寡糖决定簇特异性单克隆抗体阻断试验; ②外源性寡糖分子阻断试验; ③纯化的内源性寡糖结合试验; ④特异糖基转移酶改变相应寡糖结构后其结合能力的改变。在研究中可同时采用不